

Aus der Universitäts-Poliklinik Freiburg im Breisgau
Direktor: Prof. Dr. H. Sarre

Über eine neue semiquantitative Methode
der Eiweißbestimmung im Harn

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt

von

Einhard Weber

geboren in

Neuruppin

1966

Dekan: Prof. Dr. Hans-Ullrich Zollinger

Referent: Prof. Dr. Hans Sarre

Aus der Universitäts-Poliklinik Freiburg im Breisgau
Direktor: Prof. Dr. H. Sarre

Über eine neue semiquantitative Methode
der Eiweißbestimmung im Harn

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt

von

Einhard Weber

geboren in

Neuruppin

1966

	Seite
I. Einleitung	1
II. Proteinurie beim Gesunden	2
III. Methodik	4
1. Untersuchungsmaterial	4
2. Untersuchungsverfahren der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim	4
3. Albustix-Methode der Firma Merck	6
4. Sulfosalicylsäure-Probe	6
5. Biuretmethode	7
IV. Ergebnisse und Diskussion	10
V. Zusammenfassung	17
VI. Literaturverzeichnis	18

Anhang

Tabellen und Abbildungen
Lebenslauf



I. Einleitung

Die großen Erfolge der modernen Medizin, ablesbar an der Erhöhung der mittleren Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten, sind nicht nur auf die Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsmethoden, sondern auch auf die Anwendung neuer Untersuchungsverfahren zurückzuführen.

Die heute möglichen diagnostischen Verfahren benötigen aber im Vergleich zu früher einen wesentlich höheren Zeit- und Personalaufwand. Bemühungen, wenigstens einen Teil der notwendigen Untersuchungen dadurch zu verbessern, daß sie bei zumindest gleichem Aussagewert weniger Arbeit erfordern, können daher von ärztlicher Seite nur begrüßt werden. Die auf diese Weise erzielte Verbesserung könnte außerdem dazu führen, daß diese Untersuchungen häufiger als früher besonders in der allgemeinen Praxis durchgeführt werden und damit auch eine Frühdiagnose gestatten. Die Aktion zur Früherfassung von Diabetikern unter Einsatz neuer Methoden hat dafür hinreichend Beweise geliefert.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Genauigkeit und Zuverlässigkeit eines von der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, entwickelten Untersuchungsverfahrens zu testen, mit dem eine halbquantitative Bestimmung von Eiweiß im Urin möglich sein soll. Zu diesem Zweck wurde diese neue Methode mit anderen Untersuchungsverfahren verglichen.

Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, daß auch beim gesunden Menschen eine geringe "physiologische" Proteinurie besteht oder bestehen kann. Um den klinischen Erfordernissen gerecht zu sein, muß daher eine Methode zur Bestimmung der Eiweißkonzentration im Urin ausreichend empfindlich sein, um eine physiologische von einer pathologischen Proteinurie unterscheiden zu können. Die Ermittlung dieses Grenzbereiches war daher die Vorbedingung für die weiteren Untersuchungen.

II. Proteinurie beim Gesunden

Bereits 1895 beschrieb Mörner (14) kleine Mengen von Protein (25 - 89 mg/l) im Normalurin. Vordem hatte Lehmann (11) schon 1886 in eiweißreichen Harnen außer Albuminen auch Globuline nachgewiesen. Aber erst die grundlegende Arbeit von Rigas und Heller (16) aus dem Jahre 1951 zeigte, daß im Normalharn mehr Globuline als Albumine enthalten sind.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die von verschiedenen Untersuchern in nichtpathologischen Harnen gemessenen Mengen an Gesamtprotein, Albumin und Globulin sowie den daraus errechneten Albumin-Globulin-Quotienten; die Variation ist erklärbar durch die unterschiedlichen Meßmethoden.

Tabelle 1

Mittelwert in mg/die	Rigas (16)	Boyce (5)	McGarry (12)	Saifer (17)
Gesamtprotein	29,0	42,6-52,7	90	79,5 $\pm$ 31,2
Globulin	25,8			53 $\pm$ 27,4
Albumin	14,8			26,5 $\pm$ 9,0
A/G	0,51	0,64	0,65	0,58 $\pm$ 0,38

Saifer und Gerstenfeld (17) schrieben zu diesen Ergebnissen:

"Der bedeutende Verlust bei der Denaturierung von Urinproteinen an der Dialysemembran erklärt die niedrigen Albumin- und Globulinwerte der anderen Untersucher, da unsere Bestimmungen direkt an unkonzentrierten Urinsammlungen vollzogen wurden."

Die Gesamtproteinmenge wurde von diesen Autoren mit der sehr empfindlichen Lowry-Methode gemessen. Zu der Globulinbestimmung wandten sie die von ihnen erweiterte Tryptophan-Methode an. Diese liefert allerdings nur dann exakte Werte, wenn die Mucoproteine fehlen bzw. vorher extrahiert werden, da diese auch Tryptophan enthalten. Man entfernt sie durch Lösen in Trichloressigsäure; die Proteine werden dann nicht gelöst.

Diese genauen Methoden geben eine Gewähr dafür, daß die von Saifer und Gerstenfeld (17) angegebenen Werte zuverlässig sind. Es läßt sich daher folgern, daß bis etwa 100 mg Protein pro Liter Normalharn enthalten sein können, ohne eine pathologische Bedeutung zu haben.

Relman und Levinsky im dritten Kapitel des Buches von Strauss und Welt (19) messen einer Proteinurie erst dann pathologische Bedeutung zu, wenn die Ausscheidung 150 mg/die überschreitet. Dieses entscheidende Problem des Grenzwertes im Normalurin wird noch unübersichtlicher, wenn nicht die absolut ausgeschiedene Proteinmenge beurteilt wird, sondern deren Konzentration. Relman und Levinsky (19) geben eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 2 - 8 mg%, Saifer und Gerstenfeld (17) eine solche von $6,9 \pm 4,3$ mg% im Normalurin an. Einzelne Werte zeigen aber bei den verschiedenen Autoren wesentlich stärkere Abweichungen. Von Saifer und Gerstenfeld (17) wird so z. B. ein oberer Grenzwert von 15,4 mg% angegeben.

Aus den Untersuchungen zu dieser Frage läßt sich schließlich folgern, daß

1. ein für alle Normalurine verbindlicher oberer Grenzwert der Eiweißkonzentration nicht besteht; der Extremwert liegt etwa bei 15,4 mg%;
2. ein allgemeiner mittlerer Richtwert zur Unterscheidung zwischen normaler und pathologischer Eiweißkonzentration im Urin bei ca. 10 mg% anzusetzen ist; einschränkend muß hinzugefügt werden, daß bei manchen Individuen höhere Werte noch normal, bei anderen Personen niedrigere Werte schon pathologisch sein können.

III. Methodik

1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten insgesamt 1523 Urinproben, die von Gesunden und Nierenkranken stammten und normale oder pathologisch hohe Eiweißmengen im Harn enthielten. Es wurden für die Untersuchungen die Sammelurine von 24 Stunden verwendet.

2. Untersuchungsverfahren der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim

Bei dieser Methode reagiert ein auf einem Spezialpapierstreifen imprägnierter Indikator mit dem Eiweiß im Urin und zeigt durch seine Verfärbung sowohl das Vorhandensein als auch die angenäherte Konzentration von Eiweiß an.

Als Indikator dient Tetrabromphenolphthaleinaethylester. Diese chemische Verbindung ist auch ein Indikator für die Konzentration von H-Ionen in einer Flüssigkeit. Seine Reaktion mit Proteinen war schon Soerensen bekannt, der diesen Effekt des Indikators bei der Messung des pH-Wertes in eiweißhaltiger Lösung als "Proteinfehler" bezeichnete (18,6). Feigel und Mitarb. beschrieben 1937 diese Reaktion ausführlich und stellten fest, daß bei konstantem pH-Wert einer proteinhaltigen Lösung die Verfärbung des ursprünglich gelben Indikators nach blau proportional der Konzentration der Eiweißlösung ist (6). Die Einstellung einer konstanten Wasserstoffionenkonzentration kann dabei durch geeignete Pufferung erfolgen.

Auch der Testpapierstreifen ist gepuffert. Es ist naheliegend, daß seine Kapazität nur begrenzt sein kann. Deshalb ist bei sehr stark alkalischem pH-Wert eine Verfärbung des Indikators nicht mehr beweisend für eine Eiweißausscheidung

im Urin, da der Farbumschlag dann weniger durch die Proteinkonzentration, als vielmehr durch die H-Ionenkonzentration hervorgerufen wird (9). In Umkehrung des Soerensenschen "Proteinfehlers" könnte man den Effekt hier als "pH-Fehler" bezeichnen. Stark alkalische Urine sind selten. Da gleichzeitig mit oder neben der Eiweißbestimmung auch das pH des Urins bestimmt wird, läßt sich dieser Fehler leicht eliminieren. Leicht, weil auch zur pH-Bestimmung Teststreifen entwickelt wurden, die in ihrer Durchführung dem hier beschriebenen und untersuchten Verfahren zur Eiweißbestimmung ähnlich sind oder sogar beide Reaktionen an einem Teststreifen abzulesen gestatten; z. B. "Combur-Test". Durch Ansäuerung des Urins und evtl. nochmalige Kontrolle der Urinreaktion kann diese Fehlerquelle deshalb ausgeschlossen werden.

Zur Messung der Eiweißkonzentration im Urin wurde entsprechend den Angaben des Herstellers das Ende des Teststreifens kurz, d. h. eine halbe bis 1 1/2 Sekunden in den zu untersuchenden Urin eingetaucht und das Ergebnis nach ca. 1 Minute mit der Farbskala verglichen. Bei der ersten Untersuchungsserie von 1013 Urinproben wurde entsprechend den Farbwerten der Testcharge MF 325 folgende Einteilung vorgenommen:

1. ohne Eiweiß
2. Eiweißwerte bis 10 mg%
3. Eiweißwerte höher als in Gruppe 2, bis 30 mg%
4. Eiweißwerte höher als Gruppe 3, bis 100 mg%
5. Eiweißwerte höher als in Gruppe 4, bis 1000 mg%.

Der zweiten Testserie wurde folgende Einteilung zugrundegelegt:

1. ohne Eiweiß
2. Eiweiß bis 9 mg%
3. Eiweiß über 9, bis 25 mg%
4. Eiweiß über 25, bis 75 mg%
5. Eiweiß über 75, bis 500 mg%.

Falsch positive Reaktionen des Indikators können entsprechend den Angaben der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, durch folgende Substanzen hervorgerufen werden:

1. Desinfektionsmittel mit quaternären Ammoniumgruppen, z. B. Zephirol; eine 0,01%ige Lösung führt zu einer schwach-falsch-positiven Eiweißreaktion des Indikators.
2. Polyvinylpyrrolidon (Periston); positive Reaktion je nach Infusionsmenge und Zeitabstand zur Infusion.
3. Aethanol; positiv etwa ab 3 - 4 %.
4. Kreatinin; eine 1%ige Lösung ergibt eine Indikatorverfärbung, die etwa 10 mg Eiweiß entsprechen würde.

3. Albustix-Methode der Firma Merck

Es handelt sich dabei um ein prinzipiell gleichartiges Verfahren mit dem Indikator Tetrabromphenolblau (20). Grabener (10) hat darüber bereits eingehend berichtet. Farbskala und Einteilung der Meßbereiche unterscheiden sich von dem hier ausführlicher beschriebenen Verfahren der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim.

4. Sulfosalicylsäureprobe (Ss-P)

Dazu werden 2 - 3 ml Urin mit ca. 1 ml 3%iger oder 5 - 10 Tropfen 20%iger Sulfosalicylsäure versetzt. Trübungen oder Niederschläge werden wie folgt eingeteilt und symbolisiert (1):

1. Klare Lösung	-
2. schwache Trübung	Spur
3. sichtbar wolkig	+
4. wolkig, beginnender Niederschlag	++
5. wolkig, mäßiger Niederschlag	+++
6. wolkig, heftiger Niederschlag	++++

Die durch Trübung ausgezeichneten Proben werden anschließend kurz über dem Bunsenbrenner erhitzt. Bei Auflösung der Trübung wird die Reaktion als negativ gewertet (Trübung durch Albumosen).

Die Empfindlichkeit der Ss-P wird unterschiedlich beurteilt. Moeller (13) gibt die Erfassungsgrenze mit 1,5 mg% an; Altmann und Stellate (1) fanden dagegen in ihren Untersuchungen die folgenden Proteinwerte (gemessen mit der Biuret-Methode):

Gruppe 1:	4,3 $\pm$ 1,9 mg%	(2,4 - 6,2)
Gruppe 2:	6,6 $\pm$ 2,3 mg%	(4,3 - 8,9)
Gruppe 3:	60,4 $\pm$ 25,7 mg%	(34,7 - 86,1)
Gruppe 4:	83,5 $\pm$ 39,2 mg%	(44,3 - 122,7)
Gruppe 5:	172,2 $\pm$ 47,1 mg%	(125,1 - 219,3)
Gruppe 6:	EW $\geq$ als Gruppe 5	

Diese Ergebnisse zeigen, weniger in den Mittelwerten, viel deutlicher aber in den errechneten Grenzwerten, die enorme Überschneidung, die besonders in den Gruppen 1 und 2 sowie in 3 und 4 erkennbar wird. Deshalb haben wir diese Methode nur zur Überprüfung der Ergebnisse im unteren Konzentrationsbereich angewendet.

5. Biuret-Methode

In alkalischer Lösung geben Substanzen mit 2 oder mehr Peptidbindungen mit Kupfersalzen eine Blaufärbung, die in einem durch die Kapazität der Lösung bestimmten Bereich dem Eiweißgehalt des Untersuchungsmaterials proportional ist.

Reagentien:

- a) Biuret-Reagens; 45 g Natrium-K-Tartrat werden in ca. 400 ml 0,2 n Natronlauge gelöst. Danach werden 5 g Kupfersulfat hinzugegeben und nach dessen Lösung noch 5 g Kaliumjodid. Mit 0,2 n NaOH wird auf 1000 ml aufgefüllt.
- b) 6%ige Perchlorsäure.

Durchführung:

5 ml Urin und 5 ml Perchlorsäure werden in einem auf 10,0 ml geeichten Zentrifugenglas zusammengegeben und bleiben etwa 10 Minuten stehen. Der sich bildende Niederschlag wurde durch 10minütiges Zentrifugieren in einer Roto-Gilenta-Zentrifuge der Firma Hettich bei 3000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen. Zum Präzipitat wurden dann 5 ml des fertigen Biuretreagens gegeben und mit 0,9%iger NaCl-Lösung bis zur Marke 10,0 aufgefüllt. Nach etwa 30 Minuten wurde die Extinction der Lösung in einem Eppendorf-Fotometer gegen einen Leerwert (5 ml Biuret-Reagens + 5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung) bei 20 mm Schichtdicke mit Filter 546 μ abgelesen.

Als Standardwert verwendeten wir eine Lösung, die 0,02 ml Versatol (General Diagnostics, Warner-Chilcott), 5,0 ml Biuret-Reagens und eine entsprechende Menge der 0,9%igen NaCl-Lösung enthielt. Dies entspricht 140 mg% Eiweiß. Bei 11 Messungen lagen die Extinctionen zwischen 0,080 und 0,084 mit einem Mittelwert von 0,081 (siehe Tabelle 2).

Die Berechnung erfolgte nach der von Richterich (15) angegebenen Formel: $\frac{g \text{ EW}}{1 \text{ Urin}} = \frac{E(A)-E(L)}{E(S)-E(L)} \cdot C(S) \text{ in } \frac{g}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{0,02}{1,00}$

Dabei symbolisiert E(A) die Extinction des Versuchswertes,
E(L) " " " " Leerwertes,
E(S) " " " " Standards,
C(S) die Konzentration des Standards.

Diese Methode ist seit Jahren in der Klinik, in der diese Arbeit durchgeführt wurde, üblich und hat sich als für klinische Zwecke genau und zuverlässig erwiesen. Wir haben außerdem eine Eichreihe mit Lösungen verschiedener Eiweißkonzentrationen angefertigt. Die Abbildungen 1 und 2 sowie die Tabelle 2 zeigen, daß die oben angegebene Berechnungsmethode zuverlässig ist, da der stufenweisen Erhöhung der Eiweißkonzentration eine lineare Progression der Eichkurve entspricht.

Die Biuretmethode gilt als eine der Untersuchungen, die einen relativ einfachen Verfahrensgang mit einer relativ hohen Genauigkeit verbinden. Nach Animo (3), Aly und Mitarb. (2) sowie G.Beisenherz und Mitarb. (4) lassen sich zuverlässige und genaue Bestimmungen des Gesamteiweiß im Urin sowohl durch Verwendung der klassischen Kjeldahl-Methode wie auch mit der Biuretreaktion erzielen. Von Führ (9) wird als Erfassungsgrenze dieser Methode 0,08 mg% Eiweiß angegeben.

Die Aussagen der angeführten Untersucher wie auch die eigenen Erfahrungen mit dieser Methode veranlaßten uns, die Biuretreaktion allgemein für die Vergleichsuntersuchungen zu verwenden.

IV. Ergebnisse und Diskussion

Wir haben 393 Urinproben, die bei der Sulfosalicylsäure-Probe (Ss-Probe) "negativ" waren, "Spuren" zeigten oder "einfach positiv" reagierten, mit dem Ergebnis der uns von der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, zur Verfügung gestellten Teststreifen verglichen, um zunächst zu sehen, ob in dem unteren, allgemein mit ziemlicher Unsicherheit beurteilten Bereich eine ausreichende Übereinstimmung der beiden Verfahren besteht.

Es handelt sich in diesem unteren Bereich nur um sehr feine Abstufungen im Farbtest (Teststreifen) und bei der Ss-Probe um die Unterscheidung, ob es schon zu einer "schwachen Trübung" gekommen ist (gegenüber der klaren Lösung) oder ob es sich schon um eine "wolkige Veränderung" (gegenüber der "schwachen Trübung") handelt.

Daß es bei der mittleren Gruppe, die mit der Ss-Probe nur "Spuren" ("schwache Trübung") zeigte, am ehesten zu Fehldeutungen kommen würde, war zu erwarten und wurde auch durch das Versuchsergebnis bestätigt (siehe Tabelle 3).

Von 94 Urinen dieser Gruppe wurden 32 im Farbtest zwar als "verfärbt" erkannt, ließen sich jedoch nicht eindeutig als negativ oder positiv bezeichnen. Eine sicher positive Farbreaktion mit dem Teststreifen geben 44 dieser Urine, eine sicher negative 18. 76 Urinen, die nach dem Farbtest als eiweißhaltig anzusprechen waren, standen also 18 negative gegenüber.

Weniger ungünstig lagen die Ergebnisse in der Sulfosalicylsäure-negativen Gruppe. Hier waren von 249 Urinproben nur 9 im Farbtest sicher positiv; bei 38 war die Zuordnung erschwert, sie hatten eine geringgradige Verfärbung des Indikators herbeigeführt.

Von den 50 Urinen, die in der Ss-Probe sicher positiv reagiert hatten, waren 49 auch in der Teststreifenreaktion eindeutig positiv. Nur 1 Urin zeigte die leichte Verfärbung an, ohne daß die Farbintensität für eine eindeutig positive Zuordnung ausgereicht hätte.

Ein etwa gleiches Bild ergab sich, wenn man von den mit dem Farbtest ermittelten Abstufungen ausging und damit die Sulfosalicylsäure-Probe verglich. Bei diesen Auswertungen zeigten von 220 Farbtest-negativen Urinen nur 18 "Spuren" mit der Ss-Probe.

Von 102 eindeutig Farbtest-positiven Urinen waren nur 9 Ss-negativ; bei der mittleren Gruppe, die im Farbtest nur die "Verfärbung" erkennen ließ, waren 38 Ss-negativ, 32 zeigten Eiweißspuren in der Ss-Probe, 1 Urinwert war sicher Ss-positiv.

Läßt man die auf dem Teststreifen als "verfärbt" bezeichneten Werte unberücksichtigt und stellt nur die falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse des Teststreifens dem Ausfall der Ss-Probe gegenüber, so findet man bei 211 Ss-negativen Urinen 9 sicher falsch-positive (4,3 %) und bei 50 Ss-positiven Urinen keine falsch-negative Teststreifenreaktion.

Die dazwischenliegende Gruppe läßt sich weder durch die Teststreifen-Methode, noch durch die Ss-Probe eindeutig einordnen. Nach den Ausführungen über die Schwankungsbreite normaler Eiweißausscheidung im Urin kann diese Gruppe auch biologisch nicht eindeutig als physiologisch oder pathologisch eingeordnet werden.

Von Grabner (10) wurde 1964 eine Arbeit vorgelegt, in der ebenfalls verschiedene Methoden der Eiweißbestimmung im Urin verglichen wurden. Er fand bei 79 von insgesamt 1006 Urinen ein unterschiedliches Verhalten in den beiden hier verglichenen Reaktionen: der Teststreifenmethode (Combur-Test) und der Ss-Probe (siehe Tabelle 4).

20 Ss-negative Urine waren danach mit dem Combur-Test angedeutet positiv (+), 38 Urine mit Opaleszenz in der Ss-Probe waren im Combur-Test negativ und von 21 sicher Ss-positiven Urinen waren 14 im Combur-Test negativ und 7 angedeutet positiv (+).

Der Tabelle von Grabener ist zu entnehmen, daß diese 79 Urine nur geringe Eiweißmengen enthielten. Auch die Essigsäure-Kochprobe und die Ss-Probe zeigten nämlich nur bei 20 dieser 79 Urine übereinstimmend negative Resultate; mit 38 Urinen fiel die Essigsäure-Kochprobe negativ aus, während die Ss-Probe Opaleszenz anzeigte; eine negative Essigsäure-Kochprobe und positive Eiweißreaktion der Ss-Probe zeigten weitere 7 Urine, während die restlichen 14 Opaleszenz in der Essigsäure-Kochprobe und eine sichere Eiweißreaktion in der Sulfosalicylsäure-Probe anzeigten. Beurteilt man die Opaleszenz in der Essigsäure-Kochprobe als eindeutig "Eiweiß-positiv", so stimmen von den angeführten 79 Urinen nur 34 (20 + 14) in den beiden verglichenen Methoden Essigsäure-Kochprobe und Sulfosalicylsäure-Probe überein (ca. 43 %), während die restlichen 45 (38 + 7) Urine (ca. 57 %) falsch-negative bzw. falsch-positive Eiweiß-Reaktionen anzeigten.

Die Gegenüberstellung dieser von Grabener vorgelegten Ergebnisse ergibt eindeutig, daß die alt eingeführten klinisch-chemischen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Eiweiß im Urin in den unteren Grenzbereichen erheblich differieren und kaum mehr als einen Anhalt bieten.

Von besonderem Interesse war für uns in diesem Zusammenhang eine Gegenüberstellung der Befunde von Sulfosalicylsäureprobe, Teststreifenreaktion und Biuretmethode in dem unteren Grenzbereich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt und in Tabelle 5 aufgeführt.

Es ist zu erkennen, daß in dem gewählten unteren Bereich beide Methoden etwa die gleiche Streuung aufweisen. Von den 232 Urinen mit Eiweißkonzentration bis zu 10 mg% waren 196 in der Ss-Probe eindeutig negativ, dagegen in der Teststreifenreaktion nur 178. Sicher falsch-positive Befunde traten in der Teststreifenreaktion 13mal, in der Ss-Probe 6mal auf.

Diese Differenz erscheint uns gering und wenig bedeutsam; bedeutet doch ein falsch-positiver Befund in einer Suchprobe für einen Patienten eine geringere Gefahr als ein falsch-negatives Ergebnis. In diesem Falle, bei Eiweißkonzentrationen zwischen 10 und 30 mg%, liegen die Werte für den Teststreifen günstiger als für die Ss-Probe. Von 155 Urinen mit Eiweißkonzentrationen in diesem Bereich waren nur 39 mit der Ss-Probe eindeutig positiv, mit dem Teststreifen aber 83. Sicher falsch-negative Ergebnisse ergab die Ss-Probe hier in 54 Fällen, die Teststreifenreaktion in 42 Fällen. Noch ungünstiger für die Ss-Probe liegen die Zahlenwerte, wenn man die zweifelhaften Befunde (Ss-Probe: Spuren; Teststreifen: verfärbt) zu den (falsch) negativen addiert, wie es wahrscheinlich in praxi meistens geschieht. Dann stehen 116 falsch-negativen Befunden bei der Ss-Probe nur 72 ebensolche mit dem Teststreifen gegenüber.

Bei den 6 Urinproben, die mehr als 30 mg% Eiweiß enthielten, traten eindeutig falsch-negative Befunde in keiner der beiden Reaktionen auf; 1 Harn zeigte allerdings in der Ss-Probe nur Eiweiß-"Spuren" an.

Aus diesen angeführten Untersuchungen läßt sich schließen, daß die Empfindlichkeit der von uns geprüften Teststreifenmethode der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, in dem unteren Meßbereich ausreichend genau erscheint und den allgemein üblichen Nachweismethoden (Sulfosalicylsäureprobe, Essigsäure-Kochprobe) zumindest gleichwertig an die Seite gestellt werden kann. Der geringere Personal-, Zeit- und Materialaufwand, und damit die entstehenden Kosten bleiben in diesem Vergleich noch unberücksichtigt.

In den weiteren Untersuchungen war die Frage zu beantworten, ob die Teststreifenmethode auch in dem Bereich sicher pathologischer Eiweißausscheidung mit dem Urin ausreichend quantitativ genau ist. Wir verglichen dazu in 2 Untersuchungsreihen die Farbreaktion des

Streifentests mit den Eiweißwerten, die mit Hilfe der beschriebenen Biuretmethode gewonnen wurden. In der ersten Serie prüften wir 1013 Urine. In Tabelle 6 und Abbildung 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe zusammengestellt. Von 230 Urinen, die mit der Biuretmethode Eiweißkonzentrationen bis 10 mg% enthielten, zeigten 12 (= 5,2 %) im Farbstest einen höheren Eiweißwert an. Deutlich mehr Fehlbestimmungen traten in der nächsten Gruppe auf, die - mit der Biuretmethode gemessen - Eiweißkonzentrationen von 10 bis 30 mg% enthielt. Hier zeigten 72 von 173 Urinproben (= 41,6 %) mit der Teststreifenmethode einen geringeren Wert an, 17 (= 9,8 %) einen höheren.

In den weiteren Gruppen nahm dann die Zahl der übereinstimmenden Resultate zu. Von 134 Urinproben zeigten in der Gruppe von über 30 bis 100 mg% Eiweiß 6 (= 4,4 %) bei der Teststreifenmethode einen geringeren Eiweißwert an, 25 (= 18,6 %) einen höheren. In dem Konzentrationsbereich von über 100 bis 1000 mg% Eiweiß zeigten von 400 Urinen nur 5 (= 1,2 %) einen geringeren und nur 30 (= 7,5 %) einen höheren Wert an.

In der Gruppe mit Eiweißkonzentrationen über 1000 mg% lagen 9,2 % der untersuchten Urine im Farbstest niedriger. Insgesamt stehen also bei den 1013 Bestimmungen 839 übereinstimmenden (= 82,8 %) 174 divergierende (= 17,2 %) Meßergebnisse gegenüber.

Diese Ergebnisse überraschen. Da die Biuret-Methode eine von subjektiven Einflüssen freie, exakte und objektive Untersuchungsmethode darstellt, die Teststreifenmethode dagegen auf der subjektiven Einschätzung und Einordnung von relativ geringen Farb-abstufungen beruht, war eigentlich anzunehmen, daß wesentlich mehr Fehlbestimmungen auftreten würden. Die geringe Fehlerquote im Gesamtuntersuchungsmaterial ist, wie die Betrachtung der Tabellen zeigt, vor allem durch die gute Übereinstimmung bei den Gruppen mit höherem Proteingehalt gegeben. Die Feststellung von Grabenor, der die Teststreifenmethode mit der Ss-Probe und der Essigsäure-Kochprobe verglich, daß bei mittelschweren bis schweren

Proteinurien die Teststreifenmethode der Essigsäure-Kochprobe nicht nachsteht, kann - wie das Ergebnis dieser ersten Untersuchungsreihe zeigt - weiter ausgelegt werden zu der Feststellung, daß etwa von 30 mg% Eiweiß im Urin an auch im Vergleich mit der Biuretmethode eine ausreichend genaue Zuverlässigkeit der geprüften Teststreifenreaktion besteht. Betrachtet man nämlich diese Gruppen mit insgesamt 610 Urinen zusammen, so weichen davon nur 73 Werte (= 11,9 %) von denen der drei Teststreifengruppen ab.

In einer prinzipiell gleichen Untersuchungsreihe mit ebenfalls 1013 Urinen, deren Zusammensetzung sich nur geringfügig von der vorher untersuchten Serie unterschied, haben wir die Albustix-Testmethode mit den Ergebnissen der Biuret-Messungen verglichen. Wir sind dabei im Prinzip (siehe Tabelle 7 und Abbildung 5) zu ähnlichen Ergebnissen gekommen.

Auch hier traten nur geringe Abweichungen in den Gruppen mit den niedrigsten und den höchsten Eiweißkonzentrationen auf, die falschen Zuordnungen waren ebenfalls in der Gruppe von "Über 10 bis 30 mg%" am höchsten. Bei Zusammenfassung der beiden Gruppen zwischen 100 und 1000 mg% Eiweiß stehen hier insgesamt 811 übereinstimmenden Ergebnissen (= 80,1 %) 202 divergierende (19,9 %) gegenüber.

Die Prozentwerte der beiden Vergleichsuntersuchungen mit dem Teststreifen der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, und mit Albustix liegen also in diesem Falle mit 82,8 bzw. 80,1 % für die richtig bestimmte Eiweißkonzentration ziemlich genau beieinander.

Ungünstiger wird das Bild für die Albustix-Methode aber, wenn man der weiteren Unterteilung, wie sie der Hersteller vorgenommen hat, folgt und zwischen 100 und 1000 mg% noch eine Abgrenzung bei 300 mg% vornimmt.

Die abweichenden Ergebnisse in diesen beiden Gruppen liegen dann mit 1,0 und 38,8 % bzw. 11,5 und 15,2 % relativ hoch und nähern sich damit den Abweichungen in der Gruppe von "10 bis 30 mg%", die ja bei beiden Teststreifenmethoden die höchste Fehlerquote aufwies. Insgesamt 714 (= 70,4 %) übereinstimmenden Resultaten stehen dann 219 (= 29,6 %) falsche Resultate gegenüber.

Diese Untersuchungsreihe zeigt deutlich die Grenzen der Teststreifenmethode. Zu feine Farbunterschiede werden nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit vom Auswerter erkannt und führen insgesamt zu einer deutlichen Abschwächung der Aussagekraft. Zu weitgehende Vorstellungen über die Genauigkeit der Teststreifenmethode erscheinen dann eher geeignet, dieses neue Verfahren in Mißkredit zu bringen.

Mit dem Teststreifen MF 325 der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH war in den ersten Versuchen die Ablesung der stärksten Indikatorverfärbung bei Eiweißkonzentrationen von 1000 mg% und darüber unbefriedigend. Nach verschiedenen Versuchen wurde später vom Hersteller die Einstellung des Indikators etwas verändert. Die neuen Teststreifen (im Handel als "Combur-Test" und "Urei-Test") mit den geänderten Eiweißmeßbereichen und ihren entsprechenden Indikatorverfärbungen haben wir weiter an 510 Urinen mit verschiedenen Eiweißkonzentrationen geprüft (siehe Tabelle 8, Abbildung 6).

Da in früheren Untersuchungen die allgemeine Empfindlichkeit des Teststreifens im unteren Bereich sowie die Übereinstimmung in den einzelnen Bereichen mit höheren Eiweißkonzentrationen als ausreichend gefunden wurde, wollten wir in dieser Serie nur feststellen, ob die neu angegebene obere Grenze von 500 mg% genügend zuverlässig angezeigt wird.

Stärker noch als die tabellarische Aufstellung zeigt die Graphik dieses Versuches die ausreichende Genauigkeit in diesem oberen Bereich. Nur insgesamt 50 (entsprechend 16 %) von 297 Urinen zeigten mit dem "Combur-Test" höhere oder niedrigere Eiweißwerte als 75 bis 500 mg% an. Unsere früheren Feststellungen über die ausreichende Genauigkeit dieser semiquantitativen Eiweißbestimmungsmethode erfuhren dadurch eine weitere Bestätigung.

V. Zusammenfassung

Das von der Firma C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, entwickelte halbquantitative Verfahren zur Bestimmung von Eiweiß im Urin wurde an 1523 Urinen geprüft. Die Grenze zwischen physiologischer und pathologischer Eiweißausscheidung wurde entsprechend den Angaben früherer Untersucher bei etwa 10 mg% angenommen. Bei Vergleich der Teststreifenreaktion mit der Sulfosalicylsäureprobe zeigten sich in diesem unteren Meßbereich ausreichende Übereinstimmungen bei beiden Verfahren. Die Zahl der falsch negativen Ergebnisse war sogar bei der Teststreifenreaktion deutlich kleiner als bei der Sulfosalicylsäure-Probe, wenn als Vergleichswert die mit der Biuretmethode ermittelten Ergebnisse benutzt wurden. Bei Berücksichtigung des geringeren Personal-, Material- und Zeitaufwandes erwiesen sich "Combur-Test" und "Urei-Test" der Sulfosalicylsäure-Probe überlegen.

In den von dem Hersteller angegebenen Meßbereichen zeigten "Combur-Test" und "Urei-Test" unerwartet gute Übereinstimmung mit den nach der Biuretmethode gemessenen Proteinwerten. Eine Erhöhung der Genauigkeit erscheint ohne prinzipielle Änderungen der Methode nicht möglich, insbesondere führt eine weitere Unterteilung der Meßbereiche zu einer erheblichen Zunahme der Fehlbestimmungen. Für orientierende Untersuchungen ist das geprüfte Testverfahren auch im höheren Meßbereich ausreichend; exakte Proteinbestimmungsverfahren, wie etwa die Biuretmethode, kann die Teststreifenreaktion nicht ersetzen.

VI. Literaturverzeichnis

1. Altman, K. A. und Stellate, R.:
Variation of Protein Content of Urine in a 24-hour Period
Clin. Chem. 9 (1963) 63
2. Aly, F. W., Eggstein, M., Dehmer, K.:
Kritische Bemerkungen zur elektrophoretischen Untersuchung
der Proteinurie
65. Verh. dtsh. Ges. f. inn. Med. (1959) 643 - 650
3. Annino, J. S.:
Clinical Chemistry (2nd ed.) Boston: Little, Brown (1960),
zitiert nach Strauss und Welt (s. dort)
4. Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase,
Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und
Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. f. Naturforschung 8 b (1953) 555 - 577
5. Boyce, W. H., Garvey, F. K. and Norfloet, C. M.:
Proteins and other biocolloids of urine in health and in
calculous disease. Electrophoretic studies at pH 4.5 and
8.6 of those components soluble in molar sodium chloride
J. Clin. Invest. 33 (1954) 1287
6. Feigl, F. und Anger, V.:
Eine Tüpfelreaktion zum Nachweis von nativem Eiweiß
Mikrochem. Acta 2 (1937) 107 - 110
7. Frazer, S. C.:
Brit. Med. J. 1 (1958) 981 - 983,
zitiert nach Gemmer, K.-P., Inaugural-Diss. Marburg (1962)
8. Free, A. H., Rupe, C. O., Metzler, J.:
Studies with a New Colorimetric Test for Proteinuria
Clin. Chem. 3 (1957) 716 - 727
9. Führ, J., Hinz, O. S.:
Experimenteller Beitrag zur Bestimmung kleinster Eiweißmengen
in biologischem Material
Klin. Wschr. 33 (1955) 87 - 90

10. Grabener, E.:
Teststreifen in der routinemäßigen Harndiagnostik
Münch. Med. Wschr. 106 (1964) 2346 - 2349
11. Lehmann, J. C.:
Arch. path. Anat. (Virchow's) 36 (1886) 125,
zitiert nach Saifer, A. und Gerstenfeld, S. (s. dort)
12. McGarry, E., Sehon, A. H., Rose, B.:
The isolation and electrophoretic characterization of the
proteins in the urine of normal subjects
J. Clin. Invest. 34 (1955) 832
13. Moeller, J.:
Leitsymptom: Proteinurie
Münch. Med. Wschr. 102 (1960) 830 - 835
14. Moerner, K. A. H.:
Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden
Substanzen des normalen Menschenharns
Skandinav. Arch. Physiol. 6 (1895) 332
15. Richterich, R.:
Klinische Chemie (Theorie und Praxis)
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M. (1965)
16. Rigas, O. A., Heller, C. G.:
The amount and nature of urinary proteins in normal human subjects
J. Clin. Invest. 30 (1951) 853
17. Saifer, A., Gerstenfeld, S.:
Photometric Determination of Urinary Proteins
Clin. Chem. 10. (1964) 321 - 334
18. Soerensen, S. P. L.:
Biochem. Ztschr. 21 (1909) 131,
zitiert nach Feigl, F. und Anger, V. (s. dort)
19. Strauss, M. B. und Welt, L. G.:
Disease of the Kidney
Little, Brown & Co., Boston (1963), S. 81 ff.
20. Wills, M. R. and McGowan, G. K.:
The reliability of the Albustix-Test for proteinuria
J. Clin. Pathol. 16 (1963) 487

Tabelle 2

Extinktionsmessungen zur Eichkurve

a) mit "Versatol"			b) mit Rinderserumalbumin	
ml Versatol	mg% EW	Ext.	mg% Alb.	Ext.
0,02	140	0,084	9	0,005
0,02	140	0,083	9	0,005
0,02	140	0,080	9	0,005
0,02	140	0,080	9	0,005
0,02	140	0,083	25	0,013
0,02	140	0,081	25	0,014
0,02	140	0,083	25	0,013
0,02	140	0,080	75	0,040
0,02	140	0,080	75	0,042
0,02	140	0,030	75	0,040
0,02	140	0,081	500	0,310
0,04	280	0,166	500	0,310
0,04	280	0,155	500	0,295
			500	0,275
0,06	420	0,250	1000	0,560
0,06	420	0,240	1000	0,585
0,08	560	0,325		
0,08	560	0,330		
0,10	700	0,420		
0,10	700	0,420		
0,12	840	0,485		
0,12	840	0,490		
0,14	980	0,550		
0,14	980	0,570		
0,16	1120	0,650		
0,16	1120	0,645		

Tabelle 3

Ss-Probe	MF 325			
	1. negativ	2. unsicher "Verfärbung"	3. sicher positiv < 10 mg%	Summe Spalten 1 - 3 ohne Spalte 2
negativ -	202	38	9	249
Spuren (+)	18	32	44	94
positiv +		1	49	50
Summe	220	71	102	393

Tabelle 4 (modifiziert nach Grabener)

Zahl der Urinproben	Combur-Test	Ss-Probe	Essigs.-Kochprobe
20	(+)	∅	∅
38	∅	opal	∅
7	(+)	+	∅
14	∅	+	opal
Summe 79			

Tabelle 5

B i u r e t mg%	Ss-Probe neg. (0)		Teststreifen negativ		Ss-Probe "Spur" (x)		Teststreifen "verfärbt"		Ss-Probe positiv(Δ)		Teststreifen pos. 10 mg%	
0 - 10	196		178		30		41		6		13	232
10 - 30	54		42		62		30		39		83	155
> 30					1				5		6	6

Ss: 250 93 50 393
 Teststreifen: 220 71 102 393

Tabelle 6

MF 325							
B i u r e t							Zahl der Urinproben
mg%	Spuren - 10	>10 - 30	>30 - 100	>100 - 1000	>1000 mg%	Zahl der Urinproben	
Spuren - 10	218	12 (5,2 %)				230 (100 %)	
> 10 - 30	72 (41,6 %)	84	17 (9,8 %)			173 (100 %)	
> 30 - 100		6 (4,4 %)	103	25 (18,6 %)		134 (100 %)	
> 100 - 1000			5 (1,2 %)	365	30 (7,5 %)	400 (100 %)	
>1000 mg%				7 (9,2 %)	69	76 (100 %)	
Zahl der Urinproben	290	102	125	397	99	1013	

Tabelle 7

B i u r e t		A l b u s t i x						
mg/		Spuren - 10	> 10 - 30	> 30 - 100	> 100 - 300	> 300 - 1000	> 1000 mg%	Zahl der Urinproben
Spuren - 10	222		9 (3,8 %)					231 (100 %)
> 10 - 30	78 (40,9 %)		78	20 (11,3 %)				176 (100 %)
> 30 - 100			11 (8,4 %)	83	36 (27,6 %)			130 (100 %)
> 100 - 300				2 (1,0 %)	112	72 (38,7 %)		186 (100 %)
> 300 - 1000					25 (11,5 %)	159	33 (15,2 %)	217 (100 %)
> 1000 mg/						13 (17,8 %)	60	73
Zahl der Urinproben	300		98	105	173	244	93	1013

} 403

Tabelle 8

B i u r e t	C o m b u r - T e s t				(R)	Zahl der Urinproben	
	9 - 25	>25 - 75	>75 - 500	>500			
mg %							
9 - 25	3	1					4 (100 %)
25 - 75	9 (14 %)	45	11 (17 %)				65 (100 %)
75 - 500		22 (7 %)	247	28 (9 %)			297 (100 %)
>500			4 (3 %)	140			144 (100 %)
							441
Zahl der Urinproben	12	68	262	168			510

Abb. 1

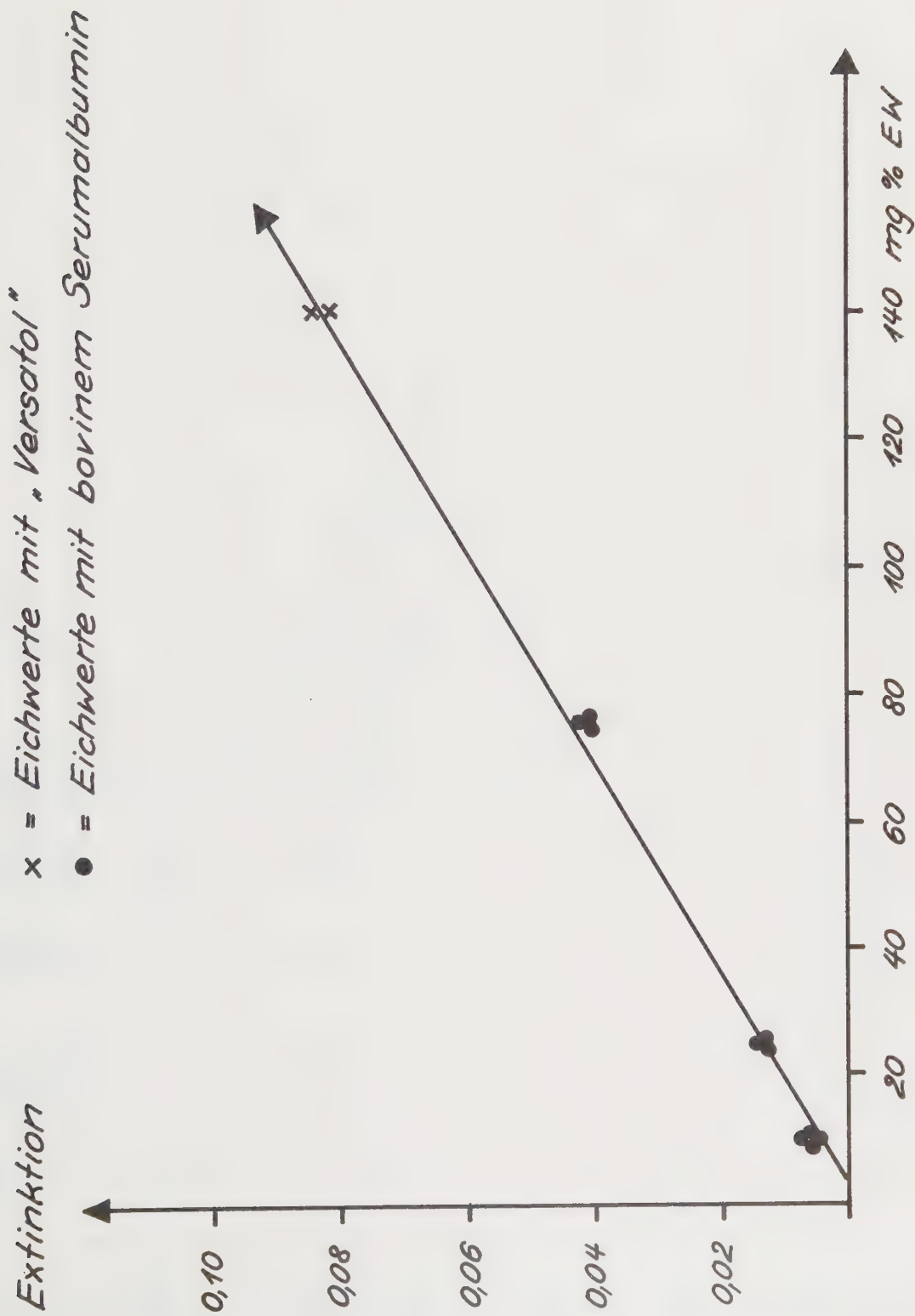
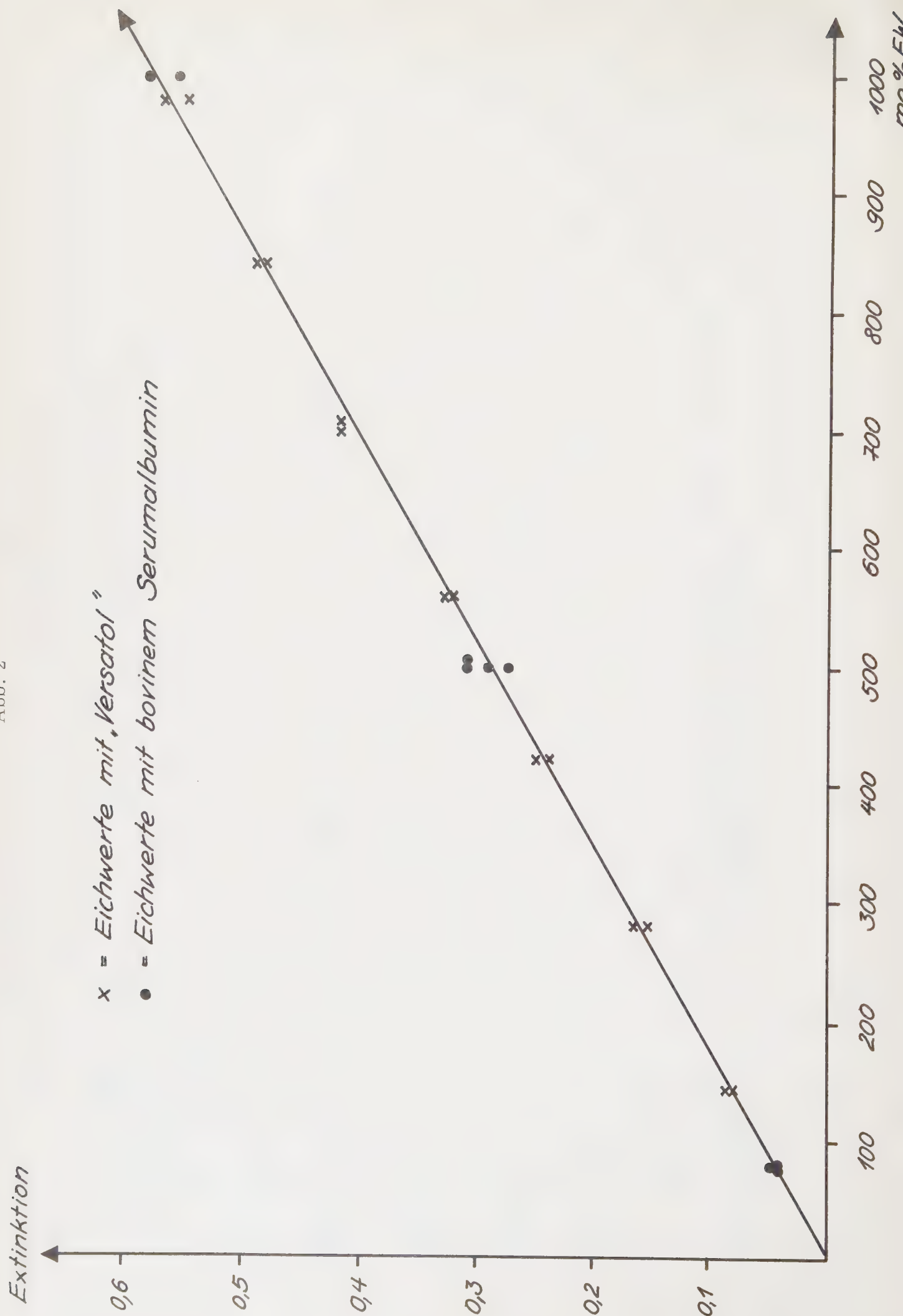
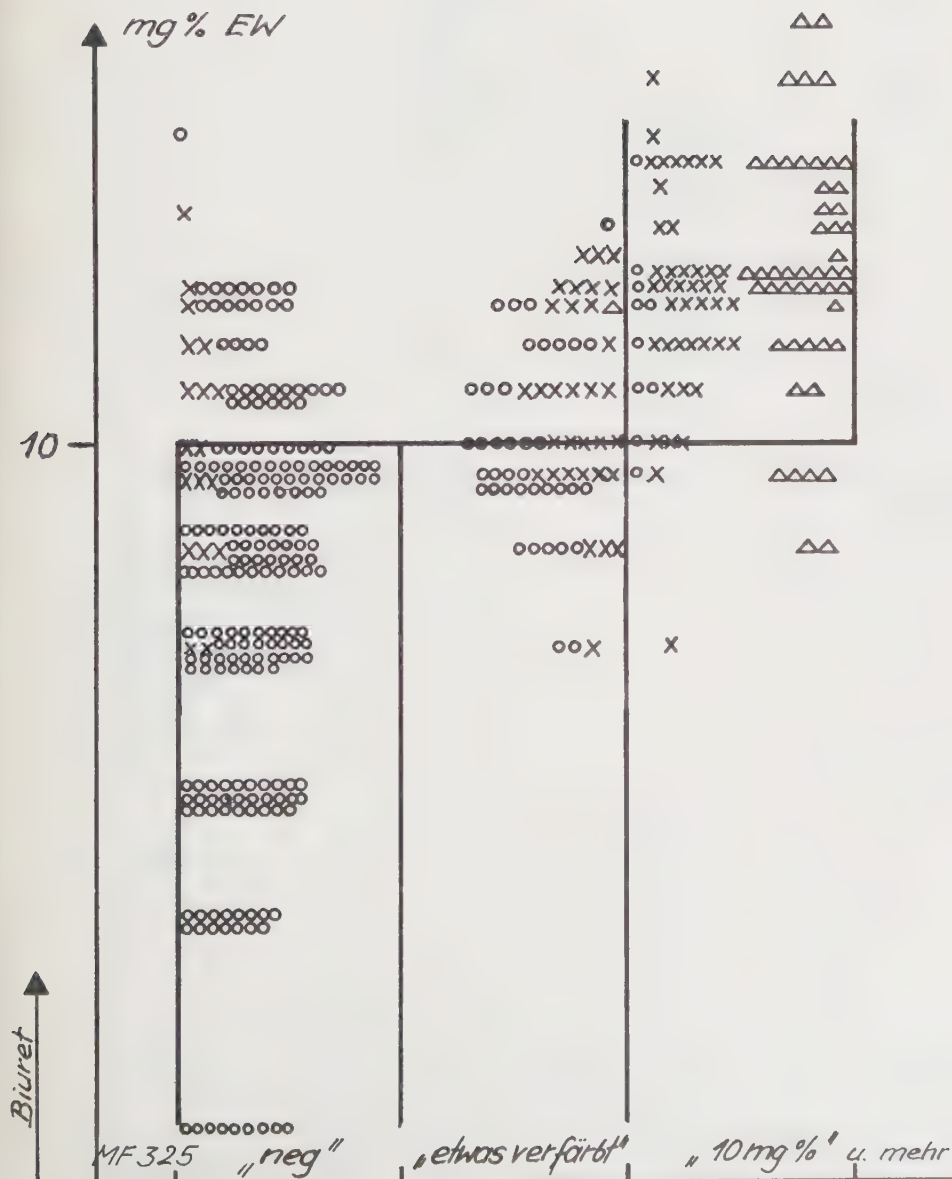


Abb. 2



Die Sulfosalicylsäure - Probe im Bereiche der ersten beiden Vergleichsfarben

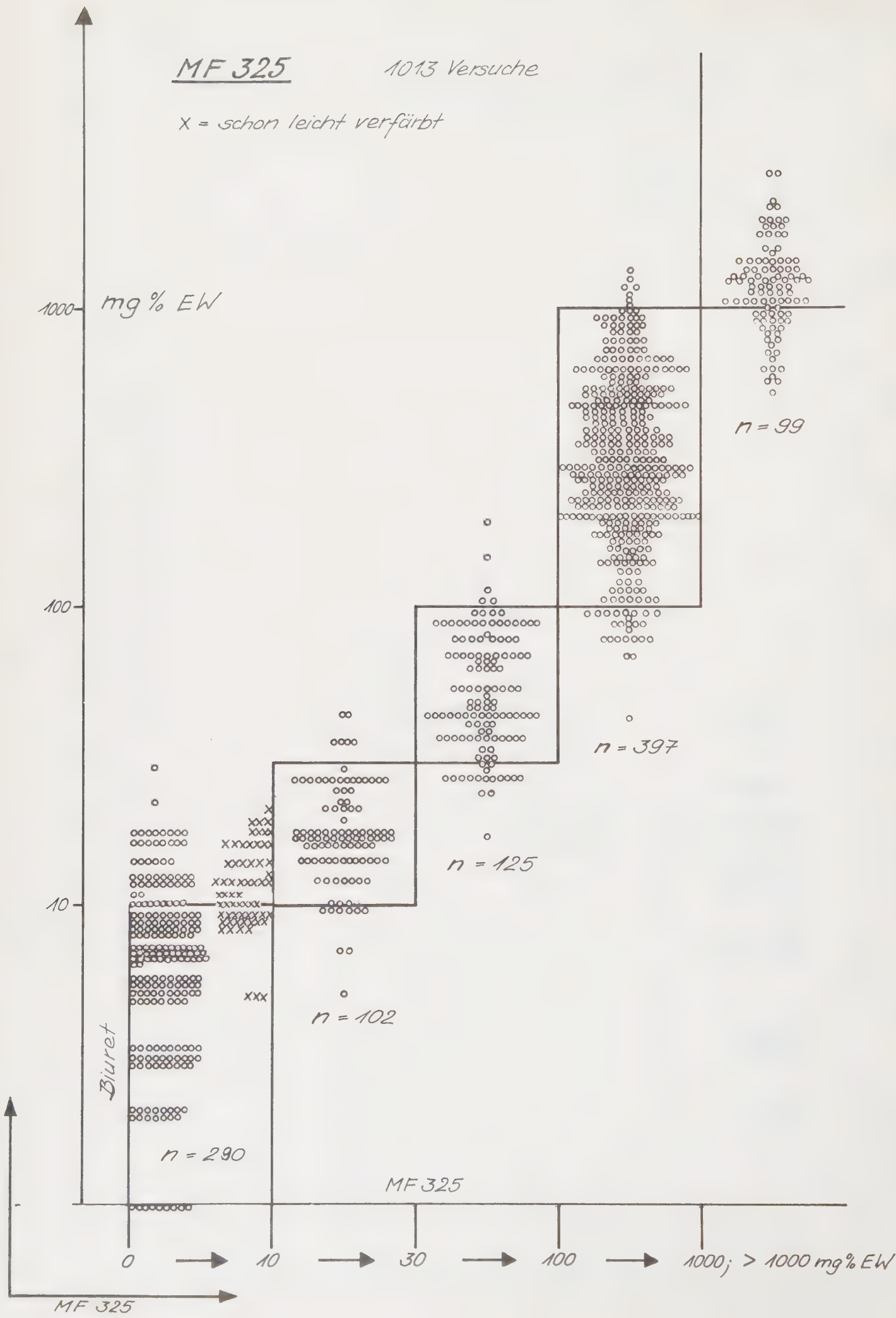
○ negativ
 x Spur
 △ positiv



MF 325

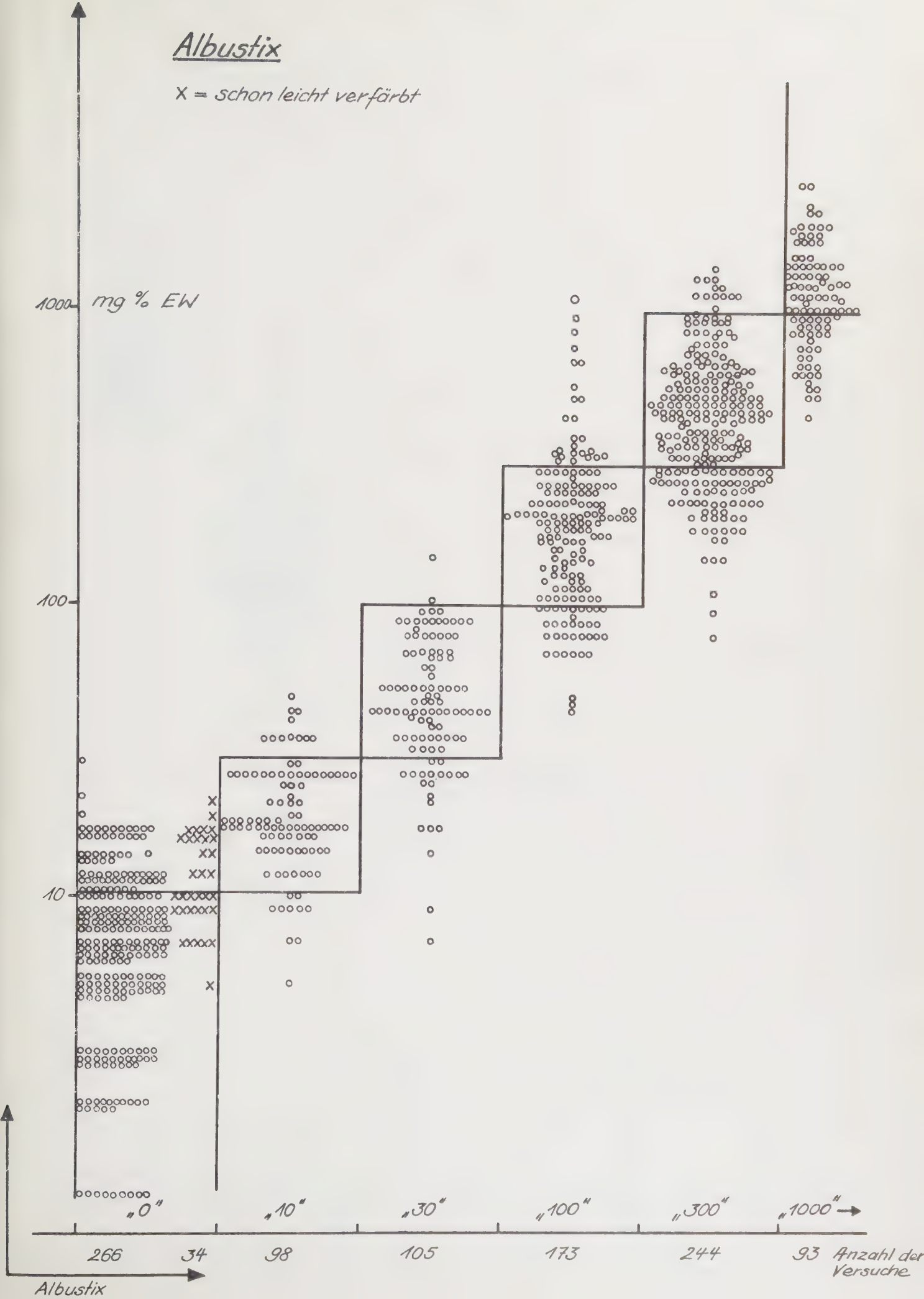
1013 Versuche

x = schon leicht verfärbt



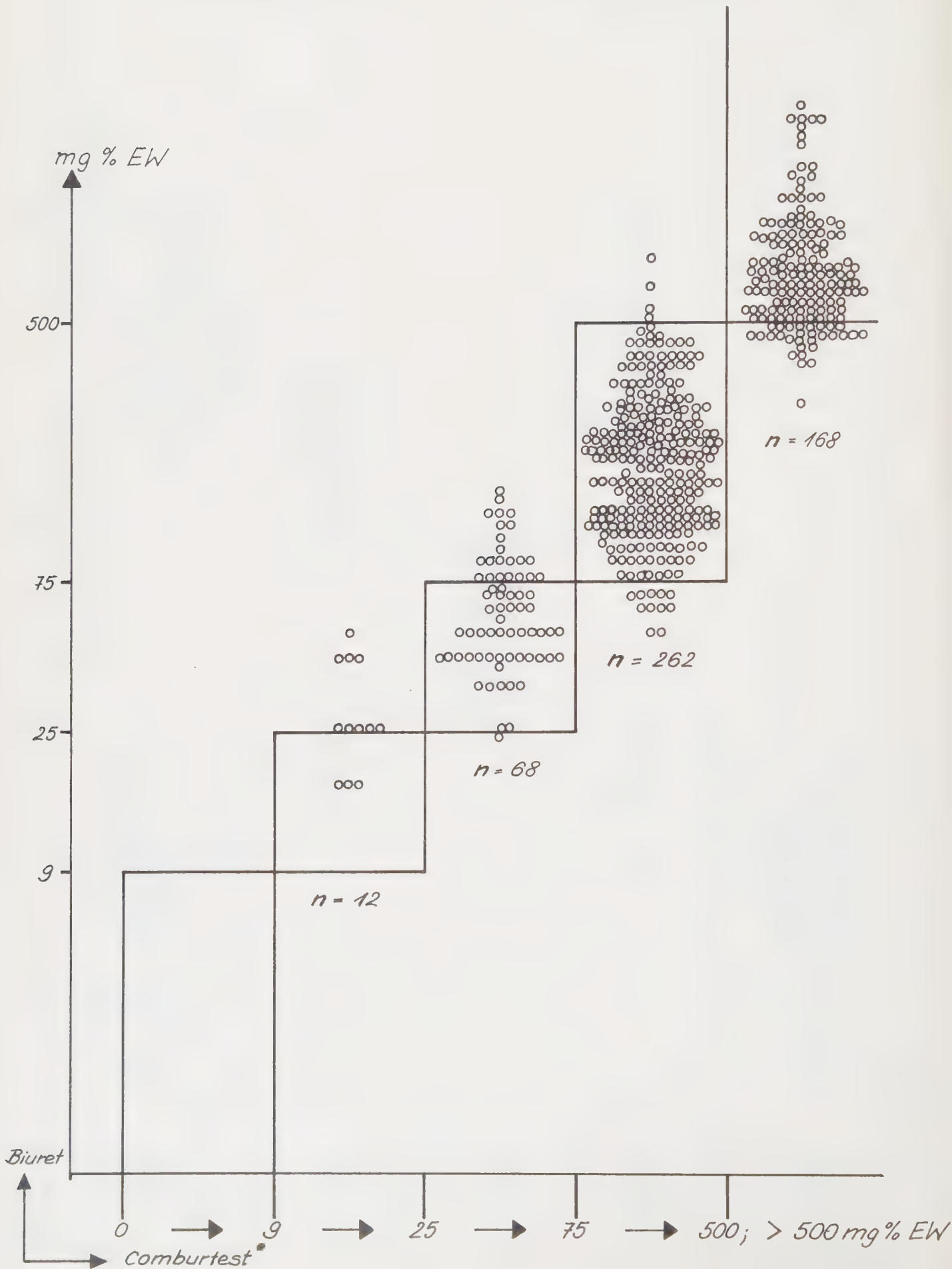
Albustix

X = schon leicht verfärbt



Combur-Test °

510 Versuche



Lebenslauf

Am 22.2.1940 wurde ich als Sohn des Gefreiten Herbert Weber und seiner Ehefrau Ulrike, geborene Paetsch, in Neuruppin geboren. Ende 1941 zogen wir nach Kattowitz. Dort wurden meine Geschwister Wolfgang und Ulrike geboren. Am 17.1.1945 verließen wir Oberschlesien und kamen Anfang Mai nach Steinhorst (Kreis Lauenburg).

Dort ließ sich meine Mutter als praktische Ärztin nieder. Ostern 1946 kam ich in die Volksschule Steinhorst; ab 1951 ging ich in Lübeck in die Oberschule zum Dom und bestand dort 1959 das Abitur.

1954 ließen sich meine Eltern scheiden.

Im April 1959 ging ich als vorzeitig Dienender zur Bundeswehr und wurde nach 18 Monaten als Leutnant d. R. entlassen. 1965 wurde ich zum Oberleutnant d. R. befördert.

Im November 1960 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Freiburg und bestand dort am 31.10.1963 das Physikum. Danach ging ich für je ein Semester nach Tübingen und Wien und kehrte anschließend nach Freiburg zurück. Nach 12 Semestern Medizinstudium habe ich dort Ende November 1966 das medizinische Staatsexamen bestanden.

Einhard Weber

